

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-047502
(43)Date of publication of application : 18.02.1997

(51)Int.Cl. A61L 27/00
A61F 2/10
// C12N 5/06

(21)Application number : 07-201137 (71)Applicant : MENICON CO LTD
(22)Date of filing : 07.08.1995 (72)Inventor : KUROYANAGI TAKAMITSU
TAKAHASHI KOZO
SUGIYAMA AKIHISA

(54) CULTIVATED SKIN AND METHOD FOR MAKING THE SAME

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To smoothly supply enough nutriments for epidermis cells and/or fibroblasts on collagen nonwoven fabric of a cultivated skin and to smoothly discharge exuding liquid from the surface of a wound to which the cultivated skin is applied.
SOLUTION: The substrate of this cultivated skin is made of collagen nonwoven fabric which is strong enough to be easily handled. When the cultivated skin with the substrate is applied to the surface of a wound, nutriments can be smoothly supplied to cells seeded and cultivated on the cultivated skin from the surface of the wound to which the cultivated skin is applied, and the liquid exuding from the surface of the wound and staying there can be smoothly discharged.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-47502

(43) 公開日 平成9年(1997)2月18日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 L 27/00			A 6 1 L 27/00	C
A 6 1 F 2/10			A 6 1 F 2/10	
// C 1 2 N 5/06		9281-4B	C 1 2 N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平7-201137	(71) 出願人	000138082 株式会社メニコン 愛知県名古屋市中区葵3丁目21番19号
(22) 出願日	平成7年(1995)8月7日	(72) 発明者	黒柳 能光 神奈川県座間市小松原一丁目5137番地1
		(72) 発明者	高橋 耕造 愛知県名古屋市西区枇杷島3丁目12番7号 株式会社メニコン内
		(72) 発明者	杉山 寧寿 愛知県名古屋市西区枇杷島3丁目12番7号 株式会社メニコン内
		(74) 代理人	弁理士 朝日奈 宗太 (外1名)

(54) 【発明の名称】 培養皮膚およびその製造法

(57) 【要約】

【課題】 コラーゲン不織布における表皮細胞および／または線維芽細胞への十分な栄養分の供給ならびに適用創面からの浸出液の排出を円滑に行ないうる培養皮膚を提供する。

【解決手段】 取扱いやすい強度を有し、培養皮膚適用時に前記培養皮膚適用創面から培養皮膚に播種培養された細胞への栄養供給、および適用創面に滞留する浸出液の排出が円滑に行なわれうるコラーゲン不織布を基材とする培養皮膚およびその製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コラーゲン不織布の少なくとも片面に皮膚由来の線維芽細胞を播種培養する工程を含んでなる培養皮膚の製造法。

【請求項2】 コラーゲン不織布の片面に表皮細胞を播種培養する工程を含んでなる培養皮膚の製造法。

【請求項3】 コラーゲン不織布の少なくとも片面に皮膚由来の線維芽細胞を播種培養し、かつ該不織布の片面に表皮細胞を播種培養する工程を含んでなる培養皮膚の製造法。

【請求項4】 コラーゲンがアテロコラーゲンである請求項1、2または3記載の製造法。

【請求項5】 コラーゲン不織布と培養された皮膚由来の細胞からなる培養皮膚。

【請求項6】 コラーゲン不織布と培養された皮膚由来の線維芽細胞からなる培養皮膚であって、該線維芽細胞が前記不織布の少なくとも片面に播種培養された培養皮膚。

【請求項7】 コラーゲン不織布と培養された表皮細胞からなる培養皮膚であって、該表皮細胞が前記不織布の片面に播種培養された培養皮膚。

【請求項8】 コラーゲン不織布と培養された皮膚由来の線維芽細胞および表皮細胞からなる培養皮膚であって、該線維芽細胞が前記不織布の少なくとも片面に播種培養され、かつ該表皮細胞が前記不織布の片面に播種培養された培養皮膚。

【請求項9】 コラーゲンがアテロコラーゲンである請求項5、6、7または8記載の培養皮膚。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は培養皮膚およびその製造法に関する。さらに詳しくは、熱傷、創傷、褥瘡または皮膚潰瘍などの皮膚欠損創に用いて、欠損組織を早期に再建させるまたは治療するための培養皮膚およびその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より浅達性Ⅱ度熱傷や軽度の褥瘡など真皮の浅い部分に達する皮膚欠損創の治療としては創傷被覆材の適用あるいは軟膏塗布ガーゼなどの適用が一般的である。しかしながら、深達性Ⅱ度熱傷、Ⅲ度熱傷あるいはⅡ度以上の褥瘡など真皮の深い部分に達する広範囲の皮膚欠損を負ったばあい、自己の表皮細胞増殖による皮膚組織の再建は期待できない。そこで、まず壊死組織あるいは不良肉芽組織を切除し、創傷被覆材を適用して良好な肉芽組織を再建したのち、自家分層植皮を行なうことにより皮膚を再建するという治療が行われてきた。しかし、自家分層植皮を行なうばあい、自己の健全な部位から採皮するが、採皮した部位には傷跡が残るという整容についての問題が生じる。また患部が極めて広範囲であるばあいには、自家分層植皮は困難である。

【0003】この問題を解決するために、わずかな皮膚片から表皮細胞あるいは線維芽細胞を採取し、培養フラスコ内で大量培養する技術が開発され、これらの培養細胞を用いた種々の培養皮膚が開発されてきている。

【0004】ハワード・グリーン (H. Green)、ジェームズ・レインワルド (J. Rheinwald) らが開発した培養表皮シートは、切手大の皮膚を採取し、表皮細胞を培養フラスコ内で大量培養して表皮シートをうるものであるが、該シートを培養フラスコから剥離する際の酵素処理によって最も重要な細胞である基底細胞が損傷を受けるために自家移植において生着率が低いという問題点が指摘されている (黒柳能光、生体材料9巻、1991年2月号参照)。

【0005】また、ユージーン・ベル (E. Bell) ら (サイエンス (Science)、211巻、1052~1054頁、1981年3月号参照) は、皮膚から分離、採取した表皮細胞および線維芽細胞を培養フラスコ中で大量に培養し、線維芽細胞を組み込んだコラーゲンゲル上に表皮細胞を重層化させた培養皮膚を開発した。

【0006】さらに、スティーブン・ボイス (S. Boyce) ら (サージェリー (SURGERY)、103巻、421~431頁、1988年4月号参照) は、皮膚から採取した表皮細胞を培養フラスコ中で大量に培養し、これを少量のコンドロイチン-6-硫酸を添加したコラーゲンスポンジ上に播種し重層化させた培養皮膚を開発している。

【0007】また、アテロコラーゲンを基材とする培養皮膚が、特開昭第62-246371号公報および特開平第4-332561号公報に記載されている。特開昭第62-246371号公報には、アテロコラーゲンシートを基材とする培養皮膚が記載されているが、シートに貫通孔がないので、移植床からもたらされる細胞増殖などに欠かすことのできない栄養分がシートを透過してシート上の表皮細胞にまで供給され難いために自家移植において表皮の生着率が低いという問題があった。さらに、貫通孔がないことで、移植した培養皮膚面の患部に浸出液が過度に滞留し、この排出が円滑になされず感染の温床となるという問題もあった。

【0008】特開平第4-332561号公報には、細胞播種前にあらかじめアテロコラーゲンゲルなどでコーティングすることを必須とした貫通孔を設けたアテロコラーゲンスポンジを基材とする培養皮膚が記載されている。

【0009】こうした培養皮膚は工程が煩雑であるばかりでなく、コストの高いものとなり、さらにスポンジ形状では強度にも問題があったため、より簡便で安価かつ強度のある代替品または手法の開発が望まれていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明はかかる問題を

解消するためになされたものであり、熱傷、創傷、褥瘡または皮膚潰瘍などの皮膚欠損創に用いて、欠損した組織を早期に再建させるための培養皮膚を提供することを目的とする。

【0011】さらに詳しくは、培養皮膚を適用した創面から培養皮膚の細胞への栄養分供給を円滑にすると共に適用創面に過度に滞留する浸出液の排出が円滑に行なわれうる機能を有する、強度のある培養皮膚を安価に提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】前記の目的は、培養皮膚用基材として不織布を用いることにより、貫通孔を設けることなく、培養皮膚適用時に前記培養皮膚適用創面から培養皮膚に播種され培養増殖された細胞への栄養供給、および適用創面に滞留する浸出液の排出が円滑に行なわれうる、強度のある培養皮膚を提供することである。

【0013】したがって本発明は、コラーゲン不織布の少なくとも片面に皮膚由来の線維芽細胞を播種培養する工程を含んでなる培養皮膚の製造法、コラーゲン不織布の片面に表皮細胞を播種培養する工程を含んでなる培養皮膚の製造法、ならびにコラーゲン不織布の少なくとも片面に皮膚由来の線維芽細胞を播種培養し、かつ該不織布の片面に表皮細胞を播種培養する工程を含んでなる培養皮膚の製造法に関する。

【0014】前記コラーゲンはアテロコラーゲンであってよい。

【0015】さらに本発明はコラーゲン不織布と培養された皮膚由来の細胞からなる培養皮膚、コラーゲン不織布と培養された皮膚由来の線維芽細胞からなる培養皮膚であって、該線維芽細胞が前記不織布の少なくとも片面に播種培養された培養皮膚、コラーゲン不織布と培養された表皮細胞からなる培養皮膚であって、該表皮細胞が前記不織布の片面で播種培養された培養皮膚およびコラーゲン不織布と培養された皮膚由来の線維芽細胞および表皮細胞からなる培養皮膚であって、該線維芽細胞が前記不織布の少なくとも片面に播種培養され、かつ該表皮細胞が前記不織布の片面に播種培養された培養皮膚に関する。

【0016】前記培養皮膚において、コラーゲンはアテロコラーゲンであってよい。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の培養皮膚用不織布に用いられるコラーゲンは、たとえばアテロコラーゲンなどのように生体適合性を有するものであることが好ましい。

【0018】本発明に用いられるコラーゲン不織布の作製法はとくに限定されないが、一般的な湿式抄紙法により作製される。すなわち、塩酸、酢酸などを用いてpHを1.5~4、好ましくは2~3に調整し、濃度を0.5~5w/v%、好ましくは1~3w/v%にしたコラ

ーゲン水溶液（紡糸原液）を紡糸ノズルから濃厚塩溶液へ紡出することによりコラーゲン繊維をえる。紡糸ノズルは、0.1~0.4mm、好ましくは0.15~0.3mmの直径を有するものであってもよい。前記濃厚塩溶液は、20~26w/v%に調整された塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの水溶液であってよい。えられたコラーゲン繊維の繊度は0.8~15デニール、好ましくは2~10デニールである。繊維の太さが0.8デニールより細いものは実用上製造しにくいいため好ましくなく、15デニールより太いと結合点が少なくなるため強度が低下し、しなやかさに欠けるため好ましくない。えられたコラーゲン繊維は室温にて風乾したのち、カッター、はさみなどの切断手段を用いて繊維を3~10mm、好ましくは4~8mmの長さの短繊維となるよう切断される。ついで、コラーゲン短繊維を水不溶性とするためにポリエポキシ化合物、アルデヒド化合物などにより架橋する。この方法は、たとえばつぎのようにして遂行できる。えられたコラーゲン短繊維を0.01~0.5v/v%のグルタルアルデヒドなどを含有する8~15w/v%の塩化ナトリウム水溶液あるいは硫酸ナトリウム水溶液などに1~3時間浸漬する。

【0019】十分に水洗したのち、蒸留水などに分散させ叩解処理して均一な分散液（スラリー）をうる。抄紙は、たとえばナイロン、ポリエステルなどの繊維、ステンレスなどの金属または樹脂から作製された50~100程度のメッシュの篩上で手抄する。もしくは前記短繊維の分散液を抄紙機にかけて抄紙する。えられるシート状のものを脱水し、25~35℃でゆるやかに風乾するかまたは室温にて減圧乾燥することによりコラーゲン不織布がえられる。

【0020】さらに、強度をさらに付与するばあいには、コラーゲンまたはゼラチンの希薄な水溶液を不織布表面に噴霧し、乾燥させる。たとえば、乾燥させた不織布にグルタルアルデヒド0.01v/v%を含む0.01~0.5w/v%コラーゲン水溶液を100mL/m²程度で噴霧して、風乾する。そののち水洗し、再度乾燥させる。

【0021】基材の強度の評価には、引張強度を採用することが好ましい。具体的には試料（不織布）をダンベル形状に切り抜き、培地または生理的食塩水に浸漬させて十分に含浸させて万能材料試験機にて引張強度を求めた。

【0022】また、コラーゲン不織布の大きさおよび厚さは患部の大きさ、深さなどにより適宜選択されるが、不織布としての特性を生かすには厚さ0.5mm程度までのものが好ましい。

【0023】このようにしてえられる培養皮膚の基材となるコラーゲン不織布は、培養皮膚適用時に適用創面から培養皮膚面または培養皮膚に組込まれた細胞への栄養

供給、および適用創面に過度に滞留する浸出液の排出が円滑に行なわれうる。

【0024】本発明の培養皮膚不織布には、その少なくとも片面において皮膚由来の細胞、たとえば表皮細胞および/または線維芽細胞が播種され培養される。前記表皮細胞とは、基底細胞を含む角質化細胞および表皮細胞層に通常存在するその他の細胞を意味するが、このうち培養増殖させるのは角質化細胞である。前記線維芽細胞とは、ここでは皮膚の真皮中の主要な細胞であり、コラーゲンをはじめとする結合組織成分を産生し、これらの成分と結合して結合組織を形成している細胞をいう。

【0025】本発明の培養皮膚は、播種される細胞に応じて以下の3種類を作製することが可能である：

①本発明のコラーゲン不織布の好ましくは両面、少なくとも片面に皮膚由来の線維芽細胞のみを播種培養させた培養皮膚（複合培養真皮）、

②本発明のコラーゲン不織布の片面に表皮細胞を播種培養させた培養皮膚（複合培養表皮）および

③本発明のコラーゲン不織布の少なくとも片面に皮膚由来の線維芽細胞を播種培養させ、かつ前記不織布の片面に表皮細胞を播種培養させた培養皮膚（複合培養皮膚）。このばあい、先に皮膚由来の線維芽細胞を播種培養する工程を行なう方が表皮細胞の脱落を防ぐことができるのでより好ましい。

【0026】前記の3種類の培養皮膚は、患部の面積、深さなどの状態や合併症の有無など患者の症状によって適宜使い分けることでより効果が発揮される。また、これらの培養皮膚を自家、他家で適宜使い分けることでより効率的な治療が期待できる。

【0027】前記表皮細胞は以下の手順で調製される。清潔な環境下で採取された皮膚（表皮および真皮の一部、または皮膚全層）を消毒し、抗生物質を含有する生理食塩水またはハンクス（Hank's）液などの緩衝液に浸漬する。この皮膚をディスパーゼ濃度を1000 U/mLに調製したダルベッコ変法イーグル最少必須培地（DMEM）（以下、「ディスパーゼ溶液」という）に浸漬したのち表皮と真皮に分離する。えられた表皮をトリプシン濃度0.25 w/v%、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA）濃度を0.5 mMに調製したハンクス液（以下、「トリプシン溶液」という）中に移し、37℃、約15分間浸漬したのち10 v/v%ウシ胎児血清（FCS）を含むDMEM（以下、この培地を「DMEM+10%FCS」という）などの培地中に移し、振とうすることにより細胞を分散させ、約400×g、5分間の遠心分離にて採取させることによってうることができる。えられた表皮細胞はたとえば、グリーン（Green）培地、NCTC168培地、MCDB153培地、とくに好ましくはグリーン培地を加えて表皮細胞懸濁液とする。

【0028】前記グリーン培地とはDMEMとハム（H

am's) F-12を3:1に混合し、ヒドロコルチゾン（0.4 μg/mL）、インスリン（5 μg/mL）、トランスフェリン（5 μg/mL）、トリヨードチロニン（0.0013 μg/mL）、コレラトキシニン（0.01 μg/mL）、アデニン（24.3 μg/mL）、表皮細胞増殖因子（0.01 μg/mL）と抗生物質を添加し、10 v/v% FCSを含んでなる表皮細胞増殖培地である（セル（Cell）40巻、677～683頁、1985年3月号参照）。

【0029】前記表皮細胞を高効率で増殖させるには、たとえばマイトマイシン処理や放射線照射などによって増殖能を消失させたマウス由来の線維芽細胞である3T3細胞を支持細胞として接着させた培養フラスコ中で培養を行なうことが好ましい。

【0030】具体的には、この3T3細胞を培養したのち、培地を除去してハンクス液ですすぎ、これを除去する。ついでマイトマイシンC 4 μg/mL含有DME M溶液を細胞全体が充分浸されるだけ加え（75 cm²培養フラスコであれば2～4 mL程度が好ましい）、37℃にて2時間程度静置したのち緩衝液で洗浄し、マイトマイシンCを除去する。こうして、3T3細胞は生きたままで増殖能のみが消失せしめられる。えられた増殖能を有しない3T3細胞を採取して、前記グリーン培地に懸濁し、 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ cells/cm²、好ましくは $5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ cells/cm²の密度になるよう調製したのち培養フラスコへ播種する。この培養フラスコに前記表皮細胞を3T3細胞を播種したのちに、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ cells/cm²、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ cells/cm²の細胞密度にて播種して接着させる。

【0031】たとえば約2×2 cmの分層皮膚からえた前記表皮細胞を5% CO₂インキュベーター中、37℃にて培養する。3T3細胞はこの培養継続中に表皮細胞がコロニーを形成する過程において培養フラスコ底面より脱離して培地中に浮き上がり、培地を交換する際に除去されるので、最終的にえられる表皮細胞にはほとんど含まれない。

【0032】表皮細胞が培養増殖したところで、この培養フラスコにディスパーゼ溶液を加え37℃にて約2時間静置して表皮細胞を培養フラスコから剥がし、さらにトリプシン溶液により分散させ遠心分離して表皮細胞を採取し、グリーン培地を添加して細胞懸濁液をえる。表皮細胞は、必要に応じて継代培養して多量の表皮細胞をえておく。えられた表皮細胞をたとえば約6×10 cmのコラーゲン不織布上に $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ cells/cm²の播種密度にて播種する。

【0033】細胞播種前に不織布をFCSに浸漬し、37℃にて約20時間静置し、こののち余分なFCSを除去しておいた不織布に前記細胞を播種すると接着が良好となる。表皮細胞が不織布に接着したのち、グリーン培

地を加えて5%CO₂インキュベーター中37℃にて3日ごとに培地を交換しながら7~21日間培養する。このようにして複合培養表皮がえられる。

【0034】前記線維芽細胞は、バイオブシーにより採取された皮膚を前記と同様に表皮と真皮に分離したのち、えられた真皮をハサミ、ホモジナイザーなどを用いて碎き、コラゲナーゼをDMEMに溶解させ0.5w/v%に調製した溶液（以下、「コラゲナーゼ溶液」という）に加え、約3時間、約37℃にて振とうして結合組織を溶解させ、うえて約400×g~約1000×g、好ましくは約600×g~約800×gで遠心分離することにより採取する。えられた線維芽細胞は、DMEM+10%FCSなどを培地として5%CO₂インキュベーター中37℃にて初代培養し、必要に応じて多くの線維芽細胞をうるように継代培養する。

【0035】えられた線維芽細胞をたとえば約6×10⁵cmのコーラーゲン不織布に播種するにあい、播種前にまず、前記した複合培養表皮作製におけると同様に不織布にFCSを含ませておく。培養した線維芽細胞をトリプシン溶液を用いて培養フラスコから剥がし、遠心分離することで採取して、DMEM+10%FCSを用いて懸濁液を調製する。この細胞懸濁液を5×10³~5×10⁵cells/cm²、好ましくは5×10⁴~2×10⁵cells/cm²の播種密度にてコーラーゲン不織布に播種する。細胞が不織布に接着したのち、DMEM+10%FCSを加え、5%CO₂インキュベーター中37℃にて3日ごとに培地を交換しながら3~21日間培養を行なう。このようにして複合培養真皮をうることができる。複合培養真皮は少なくとも不織布の片面に皮膚由来の線維芽細胞を播種し、培養してえられる。

【0036】表皮細胞および真皮細胞の両方を併せて有する複合培養皮膚は、以下のように作製される。前記した複合培養真皮の作製工程にて皮膚由来の線維芽細胞を播種し、細胞を良好に不織布に接着させたのち該不織布を裏返し、前記複合培養表皮の作製における工程を行い複合培養皮膚をうる。

【0037】このようにしてえられた培養皮膚は、創面に適用される前に、DMEMを用いて洗浄し、FCSを除いた栄養培地に置き換えておくことが好ましい。

【0038】貫通孔を設けられていない基材を用いた培養皮膚では、培養皮膚全体に栄養成分が供給され難く培養細胞の増殖、代謝を阻害することがあった。またその下部に浸出液が過度に滞留し、感染の温床となることがあるのに対し、本発明の不織布を用いた培養皮膚においては、貫通孔を設けずとも培養皮膚全体に栄養成分が供給されやすくなり、培養細胞の増殖、代謝を円滑すると共に適用創面における浸出液の排出が良好に行なわれ、良好な肉芽組織を形成するうえで極めて有用である。また複合培養表皮または複合培養皮膚を自家移植するにあいには生着率を高める効果がある。

【0039】前記細胞を不織布に良好に接着させるために、細胞接着因子としてフィブロネクチンやラミニンなどを本発明の不織布に被覆しておくとともに良好な培養皮膚がえられる。

【0040】

【実施例】以下に本発明を参考例および実施例をあげてさらに詳細に説明するが、本発明はもとよりこれら実施例に限定されるものではない。

【0041】参考例

コーラーゲン不織布の作製

2w/v%に調製したアテロコーラーゲン（株）高研製の水溶液（塩酸でpH3に調整）50mlを孔径0.2mmのノズルを通して5Lの26w/v%塩化ナトリウム水溶液を入れた凝固浴へ湿式法により紡糸し、えられた再生コーラーゲン繊維を室温で乾燥したのち、カッターで切断して長さ4~8mm繊維度10デニールの短繊維を作製した。グルタルアルデヒドを0.05v/v%となるように含有した10w/v%塩化ナトリウム水溶液200mlに、前記コーラーゲン短繊維を加えて30℃にて2時間攪拌し、30分間静置した。短繊維を取り出し、流水中に5時間浸漬して十分に洗浄し、蒸留水1Lに均一に分散させてえられた短繊維分散液を12×10cm、100メッシュのステンレス篩上で手抄により抄紙した。これを脱水し、そのまま30℃にて風乾させた。これにグルタルアルデヒド0.01v/v%を含む0.1w/v%コーラーゲン水溶液を噴霧器より100mL/m²噴霧し、30℃で風乾した。これを流水洗浄して再び風乾して、12×10cmのシート状のコーラーゲン不織布をえた。

30 【0042】実施例1

複合培養真皮の作製

清潔な環境下でバイオブシーされたヒトの皮膚片（約2×2cm、厚さ約0.5mm）をイソジン溶液（明治製菓（株）製）に浸漬して消毒し、ついでストレプトマイシン（1000μg/mL）、ペニシリン（1000U/mL）およびアンホテリシンB（2.5μg/mL）を含有したハンクス液に室温、30分間浸漬した。

【0043】つぎにディスパーゼ溶液（ディスパーゼは合同酒精（株）製、DMEMはライフテックテクノロジーズ社製）10mLに4℃にて20時間浸漬し、ピンセットを用いて表皮と真皮に分離し、えられた真皮部分をハサミでペースト状になるまで碎いてコラゲナーゼ溶液（コラゲナーゼは和光純薬工業（株）製、DMEMはライフテックテクノロジーズ社製）10mLで約3時間、37℃にて振とうし結合組織を除去したのち、約700×g、5分間の遠心分離にて沈殿させることによって線維芽細胞をえた。えられた線維芽細胞はDMEM（ライフテックテクノロジーズ社製）+10%FCSを用いて5%CO₂インキュベーター中37℃にて培養フラスコ中で3日ごとに培地を交換しながら継代培養し、増殖さ

せた。

【0044】こののち、トリプシン溶液（トリプシンはディフコ・ラボラトリーズ（DIFCO Lab.）製、EDTAは（株）同仁化学製）で細胞を剥がし、 $5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の播種密度にて参考例で作製したコラーゲン不織布に播種した。コラーゲン不織布は、線維芽細胞を播種する前にまず5mlのFCSに浸漬し、37℃にて20時間静置した。細胞播種後、室温にて6時間静置したのちDMEM+10%FCS 20mlを加え、5%CO₂インキュベーター中で37℃にて7日間、3日ごとに培地を交換しながら培養し複合培養真皮をえた。

【0045】ヌードマウスの背部に直径2cmの全層欠損を作製した。えられた複合培養真皮を欠損部形状に合わせて切り取り、適用し、被覆材と共に周囲を縫合し弾性包帯で固定した。2週間後、欠損部は浸出液の滞留を認めず、良性肉芽組織が形成されており、創縁より表皮組織の進展が認められており、順調な治癒を示した。

【0046】実施例2

複合培養皮膚の作製

表皮細胞は、ヒトの皮膚片（約2×2cm、厚さ約0.5mm）から実施例1に記載したと同様に分離した表皮を、トリプシン溶液10mlで15分間、37℃にて浸漬して処理したのちDMEM+10%FCS中に移し、振とうすることにより細胞を分散させ、約400×g、5分間の遠心分離にて沈殿させることによって集め、本明細書に記載した組成よりなるグリーン培地に懸濁した。表皮細胞は以下の支持細胞を用いて培養増殖させた。マウス由来線維芽細胞である3T3細胞はDMEM+10%FCS中、サブコンフルエントとなるまで5%CO₂インキュベーター中37℃にて培養フラスコ中で培養した。ついで、培地を除去してハanks液ですすぎ、DMEMを加えてここに最終濃度が0.0004%になるようにマイトマイシンC（和光純薬工業（株）製）含有生理的食塩水溶液（0.1mg/mL）を添加した。この培養フラスコを37℃で2時間静置したのち、ハanks液を用いて洗浄してマイトマイシンCを除*

*き、増殖能が消失した3T3細胞をトリプシン溶液にて培養フラスコから剥がし、遠心分離して採取した。えられた3T3細胞は、グリーン培地に懸濁し、計数後 $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の密度となるよう調製して培養フラスコに播種し、37℃、5%CO₂インキュベーター中で培養した。

【0047】このようにして調製した3T3細胞を播種した翌日、前記表皮細胞をこれに播種し、37℃にて5%CO₂インキュベーター中で培養増殖させた。

10 【0048】実施例1で作製した複合培養真皮の培地を除去し、複合培養真皮を反転させ、前記で培養増殖させた表皮細胞を $2 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の密度で播種した。これをクリーンベンチの中で6時間静置したのち、グリーン培地20mlを加えて5%のCO₂インキュベーター中で37℃にて14日間培養し、複合培養皮膚をえた。

【0049】試験例

培養皮膚のマトリックス（基材）としての不織布とコラーゲンスポンジとの比較

20 1w/v%コラーゲン水溶液をpH4に調整したうえでホモジネートし、気泡を含ませた。こののち、このコラーゲン水溶液を樹脂製の型（6×10cm）に流し込みアンモニアガス雰囲気下2時間静置してゲル化させた。こののち、15時間流水中にて洗浄し、これを凍結真空乾燥して約1500μW/cm²、30分間紫外線（UV P社製）を照射して約6×10cmのコラーゲンスポンジをえた。ここで作製した、スポンジ形状のものは培地中に浸漬後ピンセットで持ち上げると切れやすいが該不織布は、切れずに扱いやすいものであった。

30 【0050】参考例でえたコラーゲン不織布と前記コラーゲンスポンジをダンベル形状（ストレート部分の幅2mm）にしたものを10分間生理食塩水に浸漬し、乾かないうちに25℃、RH50%引張強度試験を行った。試験は、万能材料試験機（インストロン社製、No. 4301）によって行った。

【0051】

	Load (最大荷重時) (N)	Stress (最大荷重時) (N/mm ²)	
コラーゲン不織布	0.112	0.264	(n=6)
コラーゲンスポンジ	0.097	0.108	(n=6)

【0052】

【発明の効果】本発明によれば、取扱いやすい強度を有し、また培養皮膚適用時に前記培養皮膚適用創面から培養皮膚に播種培養された細胞への栄養供給、および適用

創面に過度に滞留する浸出液の排出が円滑に行なわれうるコラーゲン不織布を基材とする培養皮膚を提供することが可能となる。